

## GENETICA MOLECULAR DE LA HEMOFILIA A

CARLOS D. DE BRASI, IRMA R. SLAVUTSKY, IRENE B. LARRIPA.

*Departamento de Genética, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires.*

**Resumen** Desde el aislamiento del gen del factor VIII (FVIII) de coagulación, se ha elucidado una gran variedad de mutaciones causales de la hemofilia A (HemA). La imposibilidad de monitorear todas estas mutaciones, hace que en el laboratorio sólo debamos abocarnos a aquellas más prevalentes. Este es el caso de la inversión del intrón 22 sólo detectada por técnicas de biología molecular, que constituye la causa del 50% de las HemA severas. En este artículo, se discuten las ventajas e inconvenientes del uso diagnóstico de polimorfismos genéticos ligados y se refieren los aspectos moleculares de la enfermedad, tanto de la proteína como del gen del FVIII. Finalmente, se analizan las perspectivas futuras que están ofreciendo las nuevas tecnologías. La ingeniería genética aporta actualmente, dos tipos de estrategias terapéuticas en hemofilia: el uso de factores de coagulación de origen recombinante, que evita los riesgos de infección grave que introducen los concentrados plasmáticos y la terapia génica, que aunque muy promisorio, aún se encuentra en etapa pre-clínica de experimentación.

**Palabras clave:** genética molecular, hemofilia A, factor VIII, inversión molecular.

La hemofilia, enfermedad hereditaria ligada al sexo, es la coagulopatía congénita severa más común, afectando aproximadamente a 1-2 de cada 10000 varones en todas las poblaciones humanas. La enfermedad se presenta en forma extendida en la filogenia animal y ha sido observada en caninos y en equinos<sup>1</sup>.

La hemofilia es el clásico ejemplo de un rasgo recesivo ligado al sexo<sup>2</sup>. Está casi exclusivamente limitada a varones cuyos hijos son sanos y sus hijas son portadoras obligadas. Sobre una base estadística las portadoras transmiten el trastorno a la mitad de sus hijos y la condición de portadoras a la mitad de sus hijas. Se han reportado algunos casos de hemofilia en mujeres homocigotas (por isodisomía o como fruto de unión consanguínea) o dobles heterocigotas

(cuando ambos alelos del par X están afectados por distintas mutaciones). En todos los casos publicados las mujeres homocigotas con hemofilia no presentaron mayor severidad clínica que los varones hemicigotas<sup>3</sup>.

La hemofilia puede ser dividida en dos clases diferentes aunque indistinguibles clínicamente: la hemofilia A (HemA), caracterizada por un defecto de la globulina antihemofílica llamada factor VIII de coagulación (FVIII) (menos de 2 Unidades Internacionales/dl) y la hemofilia B (HemB) con deficiencia del factor IX (FIX). La HemA se presenta con una frecuencia cinco veces mayor que la HemB<sup>3</sup>.

### *Aspectos clínicos*

Existen 2 ensayos de laboratorio que permiten evaluar al FVIII en plasma: el FVIII:C que mide la actividad específica del FVIII y el FVIII:Ag que mide la cantidad de FVIII por métodos inmunoquímicos. Los pacientes con HemA pueden clasificarse de acuerdo a la severidad clínica de la enfermedad y

-----  
Recibido: 8-V-1996

Aceptado: 10-VII-1996

Dirección postal: Lic. Carlos De Brasi, Departamento de Genética, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Pacheco de Melo 3081, 1425 Buenos Aires, Argentina.

a los valores del ensayo de FVIII:C en: HemA severa, moderada y leve donde el ensayo de FVIII:C comparado con controles de coagulación normales es: <1 %, 1-5% y 5-25%, respectivamente. Valores de FVIII:C entre 25-50% se los clasifica como trastornos subhemofílicos y rara vez presentan sintomatología.

La heterogeneidad fenotípica observada en HemA puede ser medida no sólo en términos de severidad clínica sino también por la presencia o ausencia de inhibidor (anticuerpos contra el FVIII). Por el momento la presencia de inhibidor puede ser superada utilizando mayor cantidad de FVIII para corregir a valores de FVIII:C acordes con la gravedad del episodio sufrido por el paciente. El inconveniente que surge por la presencia de inhibidor será superado definitivamente cuando se conozcan los epitopes del FVIII que inducen tolerancia en el proceso de maduración normal del sistema inmune y puedan así diseñarse estrategias específicas para su inducción tardía.

*Estructura y función del factor VIII*

El FVIII es sintetizado en hepatocitos y células endoteliales como una proteína de cadena única con una secuencia líder hidrofóbica N-terminal de 19 aminoácidos (Aa) seguida por 2332 residuos que constituyen la proteína secretada. La estructura primaria del FVIII muestra 3 tipos distintos de dominios incluyendo una región triplicada de aproximadamente 330 Aa (dominios A), una región única de 980 Aa (dominio B) y una región carboxi-terminal duplicada de 150 Aa (do-

minios C), quienes están en el orden: NH<sub>2</sub>-A<sub>1</sub>-A<sub>2</sub>-B-A<sub>3</sub>-C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>-COOH (Figura 1)<sup>4, 5</sup>.

Se han encontrado homologías de secuencia entre el FVIII, el FV y la ceruloplasmina sugiriendo que estas 3 proteínas podrían estar relacionadas evolutivamente. Además, las repeticiones de dominios homólogos internos reflejarían presumiblemente procesos de duplicación o triplicación de algún gen ancestral más pequeño<sup>4, 6</sup>. Los dominios A son homólogos al dominio A triplicado encontrado en ceruloplasmina, quien muestra la estructura sin interrupción A<sub>1</sub>-A<sub>2</sub>-A<sub>3</sub><sup>4</sup>. Los dominios C son homólogos a una proteína (discoidina) encontrada en el moho y también a una proteína de unión al glóbulo graso de la leche recientemente descrita<sup>7</sup>.

El procesamiento intracelular da origen a las formas circulantes del FVIII consistentes en cadenas pesadas heterogéneas (990-120 KDa) y 2 cadenas livianas (80 KDa). Los extremos N-terminal de las especies de cadena pesada se extienden por 740 residuos comprendiendo los dominios A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub> y terminan en extensiones de longitud variable en el dominio B. La cadena liviana comienza con el residuo glutamato 1649 y se extiende hasta el extremo C-terminal en la Tyr2332. Los heterodímeros del FVIII están unidos en forma no covalente por cationes divalentes y circulan en plasma unidos al factor de von Willebrand (vWF). En esta forma el FVIII es un pro-cofactor sin actividad funcional. La conversión a la forma activa requiere el clivaje de dos uniones peptídicas Arg372-Ser373 y Arg1689-Ser1690. Una tercera unión Arg740-Ser741 es

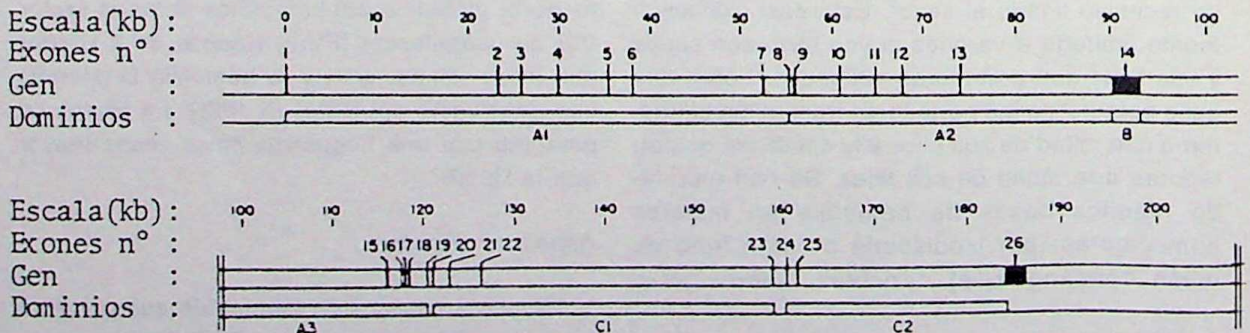


Fig. 1.- Mapa del gen de FVIII humano. Adaptación del publicado por Vehar et al en 1984<sup>4</sup>. La estructura del gen está representada esquemáticamente por barras abiertas, los 26 exones están representados por cajas llenas. La dirección de transcripción es de izquierda a derecha. La escala de longitud está sobre el gen. Debajo del gen se encuentra alineada fuera de escala la estructura de dominios de la proteína FVIII, reflejando los exones que codifican para cada región homóloga: A<sub>1</sub>-A<sub>2</sub>-B-A<sub>3</sub>-C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>.

también hidrolizada para liberar la cadena B pero se ha demostrado que este clivaje no es esencial para la activación. Las peptidasas trombina y factor Xa pueden hidrolizar estas uniones Arg-Ser. La proteína C activada (PCA), inactiva el FVIII por un único clivaje en Arg336-Met337 (Figura 2)<sup>8</sup>.

El conocimiento de las correlaciones entre estructura y función es todavía incipiente. La región ácida Val1670-Glu684 y la Tyr1680 sulfatada está involucrada en la unión con el vWF<sup>9</sup>. El clivaje de la unión Arg1689-Ser1690 en la activación, libera a este segmento y simultáneamente desarma el complejo entre el FVIII y el vWF. La región C-terminal de la cadena liviana está involucrada en la unión a fosfolípidos, esencial

para la actividad del co-factor<sup>9</sup>. Las regiones involucradas en la interacción con la enzima, FIXa y el sustrato, FX, en la formación del complejo «tenaza» son aún desconocidas.

*Mutaciones en el gen del FVIII*

El gen de FVIII tiene 186 kb de longitud, es uno de los genes más largos, caracterizados hasta el presente, contiene 26 exones (con un rango de longitudes que va desde 69 a 3106 pares de bases, pb) y 25 intrones (algunos tan largos como 32,4 kb) y está localizado en la región distal del brazo largo del cromosoma X a nivel de la banda Xq28 (Figura 1). Este gen produce un mRNA de 9 kb<sup>6,4</sup>.

La HemA no presenta ninguna alteración visible con métodos citogenéticos, y además el análisis a nivel molecular ha sido muy difícil debido al gran tamaño del gen, a su compleja organización genómica y a la heterogeneidad mutacional detectada en los distintos individuos. Después del clonado del gen del FVIII<sup>10, 11</sup>, numerosos estudios detectaron mutaciones causales en HemA severa, moderada o leve, incluyendo casi todo tipo de mutaciones<sup>12-14, 5, 15-19</sup>. En una clasificación general, las mutaciones o lesiones en el ADN pueden dividirse en dos tipos según las consecuencias que pudieran acarrear: mutaciones causales de enfermedad (en este caso ocasiona la expresión de la HemA con distinto grado de severidad) y polimorfismos genéticos (variantes genotípicas normales).

Estos últimos, los polimorfismos, cuando están ligados genéticamente al gen responsable de la enfermedad (lo suficientemente cercanos físicamente para que la probabilidad de una recombinación entre ellos, sea despreciable), pueden aportar información de gran utilidad para el consejo genético en una amplia variedad de situaciones:

- cuando aún no se conoce el gen que origina la enfermedad;
- cuando conociendo el gen, la heterogeneidad de la naturaleza de las mutaciones causales hace imposible un screening que las abarque a todas (éste es el caso de la HemB, de la HemA moderada y leve, y del 50% de la HemA severa);
- como trazador de un cromosoma específico en una familia, para poder rastrear el origen de una determinada mutación.

Por todo lo expuesto, para el caso de la HemA, el consejo genético se nutre tanto de la informa-

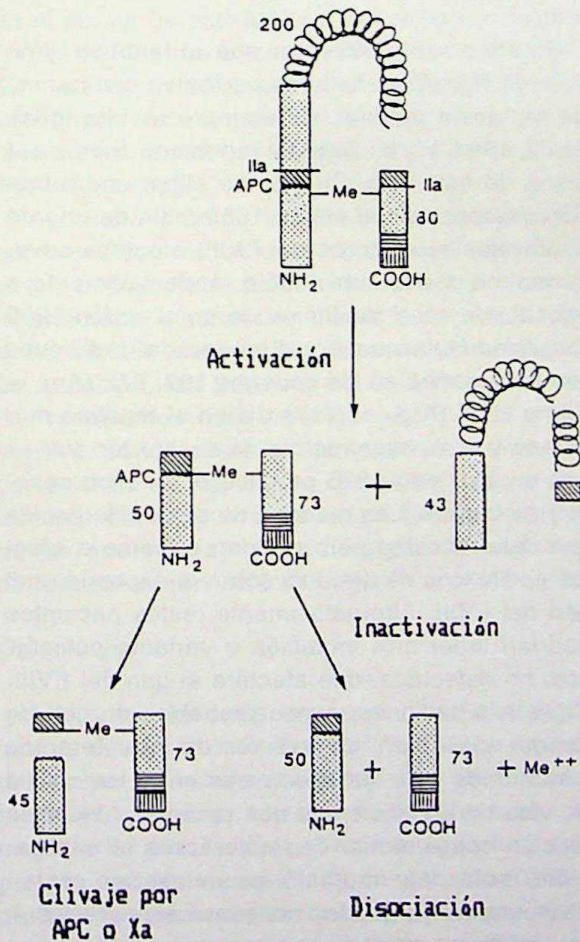


Fig. 2.- Modelo de activación e inactivación del FVIII. Adaptación del publicado por Pittman y Kauffman en 1988<sup>8</sup>. IIa (trombina activa), APC (proteína C activa), Xa (factor X activo), Me<sup>++</sup> (catión divalente), los números corresponden a las masas molares relativas (en kD) de las cadenas que componen el FVIII.

ción aportada por el análisis de polimorfismos asociados, como por el estudio directo de las mutaciones causales sobre el gen del FVIII.

#### *Polimorfismos genéticos ligados*

El análisis de polimorfismos ligados genéticamente al locus del FVIII, con RFLPs (polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción) intragénicos, extragénicos y VNTRs (también son polimorfismos de longitud pero con un número variable de repeticiones en tandem de una secuencia corta específica) permite estudiar las familias afectadas, sólo si se dispone del/los paciente/s y algunos otros miembros clave. Estos estudios de pedigree son también llamados análisis por «Gene Tracking» (arrastré con el gen) pues se pretende diagnosticar indirectamente la presencia del gen del FVIII lesionado mediante la presencia de un polimorfismo ligado, que en esa familia resulta marcador del alelo del FVIII afectado. Estos análisis por Gene Tracking pueden resultar no informativos en cerca del 30% de los casos (por ejemplo con posibles portadoras que resulten homocigotas para el polimorfismo), además hay un margen de error significativo en la asignación de estatus debido a la posible introducción de una mutación *de novo* en el individuo afectado y, por último, la posibilidad de mosaicismos puede interferir para un correcto diagnóstico<sup>20-22, 14, 25, 26</sup>.

#### *Mutaciones causales de la hemofilia A*

Cuando se encuentra una mutación en un gen, las evidencias de causalidad se proporcionan por distintas fuentes: (a) la ocurrencia de la mutación en una región de función o estructura de importancia conocida, (b) ocurrencia de la lesión en un residuo conservado evolutivamente, (c) la ocurrencia previa e independiente de esa mutación en la enfermedad, (d) la ausencia de esa mutación en muestras estadísticamente significativas de controles normales, (e) la aparición *de novo* y subsecuente co-segregación de la lesión génica y el fenotipo afectado a través de un pedigree familiar.

#### *Sustituciones nucleotídicas puntuales*

Constituyen en conjunto, el tipo de mutación más frecuente en HemA considerando todo el

rango de severidad. Los métodos de biología molecular usados para detectar mutaciones puntuales abarcan un rango muy amplio que va desde el análisis por Southern blot, hibridación con oligonucleótidos discriminantes (ASO), electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) y secuenciación del ADN.

Como era de esperarse, todas las mutaciones nonsense (aparición de un codón stop produciendo la interrupción temprana de la síntesis del FVIII) observadas fueron encontradas en pacientes con HemA severa<sup>5</sup>. En cambio, todas las mutaciones puntuales encontradas en HemA moderada o leve resultaron del tipo missense (aparición de un codón correspondiente a un Aa distinto), aunque estas mutaciones también se encontraron en pacientes con el fenotipo severo.

Es interesante observar que el fenotipo clínico de la HemA en distintos pacientes con la misma mutación puntual, no siempre resulta igual. Hasta 1991 ya se habían reportado más de 4 casos de este tipo. En uno de ellos, una mutación missense en el codón 1689 (sitio de uno de los clivajes activadores del FVIII) afectaba severamente a 1 paciente y sólo moderadamente a otros 2. Un caso similar se vió en el codón 2209 causando HemA severa y moderada. Individuos con mutaciones en los codones 162, 372 (Arg → His) y 2307 (Arg → Gln) exhiben el fenotipo moderado y leve, mientras que la sustitución Val → Leu en el residuo 326 produce el fenotipo severo y moderado. Las razones de estas diferencias son desconocidas pero podrían deberse a efectos epistáticos de otro loci sobre la expresión del gen del FVIII. Alternativamente, estos pacientes podrían tener otra mutación o variante polimórfica, no detectada, que afectara al gen del FVIII. Otras explicaciones menos probables surgen de las diferencias en los ensayos de los diferentes laboratorios y de las diferencias entre los estilos de vida de los pacientes que pudieran afectar la función coagulatoria. Cualquiera sea la explicación, sólo las mutaciones missense están involucradas ya que las nonsense siempre resultan en HemA severa.

Por otra parte, se ha encontrado inhibidor en pacientes con mutaciones puntuales, como era de esperar la mayoría de estas (10/12) correspondían a mutaciones nonsense. Las restantes 2 mutaciones encontradas en pacientes con inhi-

bidor curiosamente resultaron missense, quizás por alteración de un epítopo requerido para el estado de tolerancia inmunológica<sup>5</sup>.

Aproximadamente el 5% de los pacientes con HemA muestran un exceso de antígeno (FVIII: Ag  $\geq$  100%) junto a una reducida actividad específica (FVIII:C  $\leq$  25%). Estos casos son llamados: Material con Reacción Cruzada positivo (CRM<sup>+</sup>). El estudio de las mutaciones puntuales que pudieran observarse en estos pacientes CRM<sup>+</sup> resulta fundamental para distinguir entre las mutaciones que afectan la estabilidad del FVIII plasmático y aquellas que tienen un efecto crítico en su funcionalidad. Se han observado mutaciones productoras del fenotipo CRM<sup>+</sup> por afectar sólo la función del FVIII, por ejemplo, mutaciones en ambas Arg (372 y 1689) involucradas en el clivaje de activación y la sustitución Arg  $\rightarrow$  Gln en 2209 entre otras. En cambio la sustitución Tyr  $\rightarrow$  Phe en 1680 afecta la unión del FVIII al vWF y por ende la estabilidad de la molécula en plasma resultando el fenotipo: FVIII:C = 14% y FVIII: Ag = 25%

Aproximadamente el 40% de las mutaciones puntuales son transiciones de dinucleótidos CpG a CT o CA. Este doblete es conocido como hipermutable a consecuencia de la desaminación de la 5-metil citosina. Por esta alta probabilidad de mutación, las transiciones CpG muestran sitios recurrentes dentro del gen del FVIII y en la mayoría de los casos se ha llegado a demostrar por análisis de haplotipos con RFLPs (para determinar consanguineidad como eventual causa de la recurrencia) que se trataba de eventos mutacionales con distinto origen.

#### *Delecciones*

Las delecciones observadas exhiben un rango que va desde 1 hasta 200 kb<sup>15, 16</sup>. El 95% de las delecciones se asocia con el fenotipo severo, estudiando las excepciones se observó que en su mayoría no modificaban el marco de lectura del gen, ya sea por supresión de un número múltiplo de 3 en la secuencia codificante o bien por interesar secuencias intrónicas<sup>5</sup>. Por otra parte, no se han encontrado evidencia de puntos calientes para las delecciones. Los pacientes con HemA severa causada por delecciones tienen 5 veces más riesgo de desarrollar inhibitor que aquellos con otro tipo de mutación.

#### *Inserciones*

Hay pocos ejemplos de inactivación insercional del gen del FVIII y todos ellos conducen a HemA severa. Dos de ellos involucran la inserción en el exón 14 de secuencias ajenas al gen del FVIII como el elemento L1 (secuencias repetitivas humanas que representan retro-transposones no virales)<sup>27</sup>. La inserción de 1 nucleótido A en una cadena de Aes es otra mutación que se da con cierta frecuencia y la explicación del mecanismo es consistente con el modelo de corrimiento del apareo en la horquilla de replicación<sup>16</sup>.

#### *Duplicaciones*

Las duplicaciones son inusuales y el ejemplo mejor caracterizado de una duplicación parcial del gen del FVIII lo reportó Gitschier en 1988<sup>13</sup>. En este caso se vió la duplicación de 23 kb del intrón 22 insertado entre los exones 23 y 24. Hoy se piensa que este alelo con la duplicación constituye un estado intermedio inestable en la delección del gen del FVIII.

#### *Mutaciones que afectan el splicing*

Se han detectado mutaciones puntuales que afectan el splicing de ARNm (maduración por remoción de secuencias intrónicas que sufre el ARN en el núcleo celular), sin embargo como el FVIII es transcrito en tejidos de difícil acceso, la confirmación formal se buscó por caminos alternativos. Por esta causa, se utilizó el método de transcripción ectópica para demostrar el splicing aberrante que producían ciertas mutaciones.

Las mutaciones que producen defectos en el splicing pueden dividirse en: (a) Mutaciones en los dinucleótidos GT o AG de los sitios donador o aceptor de splicing, respectivamente, (b) Mutaciones que afecten las secuencias consenso extendidas de los sitios aceptor o donador de splicing y (c) Mutaciones que crean nuevos sitios aceptor o donador de splicing. Se han reportado 2 casos en la primera categoría y ambas resultaron en el fenotipo severo. En el grupo (b) se observaron cuatro mutaciones todas en consensos de sitios donadores de splicing que condujeron al fenotipo leve o moderado. Por último, en (c), hay dos ejemplos potenciales de activación de un sitio

críptico de splicing, uno en el intrón 4 (nuevo sitio donador) y el otro en el exón 11 (nuevo sitio aceptor) ambos resultaron en HemA moderada<sup>5</sup>.

*Mutaciones en la región 5' adyacente*

Sorpresivamente, no hay ejemplos reportados hasta la fecha de este tipo de mutación<sup>15, 16</sup>. Se espera que estas mutaciones, si es que ocurren, afecten a las secuencias regulatorias que se encuentran upstream (o 5') del punto de iniciación de la transcripción del gen del factor FVIII; que conduzcan a una expresión variable del gen y por esta variación a HemA en todo el espectro de severidad.

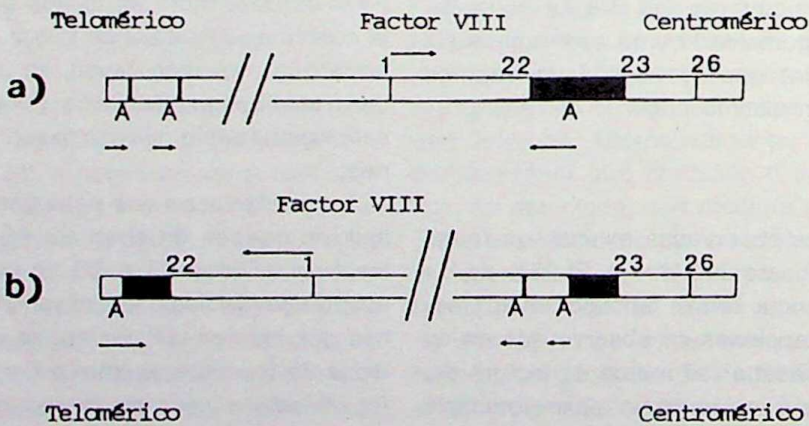
*Inversiones*

Recientemente dos grupos de investigación<sup>17, 28</sup> en forma independiente demostraron que un tipo inusual de mutación se observaba en la mitad de los casos de HemA severa. Se trata de una disrupción del gen del FVIII, debida a una inversión (inapreciable citogenéticamente) que separa a los exones 1-22 de los exones 23-26, aproximadamente 500 Kb. Esta inversión es el resultado de una recombinación homóloga intracromosómica, debida a la presencia de secuencias repetidas denominadas F8A (que transcriben en forma opuesta) que están presen-

tes en el brazo Xq fuera y dentro del intrón 22 del gen del FVIII. Debido a que hay 2 copias del gen F8A upstream del gen del FVIII, se pueden producir dos tipos de inversión: proximal o distal, ambas llevando al fenotipo de HemA severa (Figura 3). Entre ambas variantes se ha estimado que aproximadamente el 80% corresponde a la inversión distal y el 20% a la proximal<sup>18</sup>.

Investigadores de la «Johns Hopkins University» lograron demostrar mediante análisis por RFLPs que la inversión génica causante de la HemA severa se producía casi exclusivamente en la línea germinal masculina (generalmente en el abuelo materno), confirmando la hipótesis que sostiene que el apareo del brazo Xq en la meiosis femenina inhibiría el proceso de apareo intracromosómico que daría lugar a la inversión<sup>29</sup>.

Desde el punto de vista de la genética poblacional humana, el grado de adaptación biológica o *fitness* de los varones afectados, es muy reducido (dejan menor cantidad y/o calidad de descendientes que sus pares no afectados), por lo que en la población los alelos mutantes causales de la HemA deben ser renovados a una tasa de aproximadamente 1/6 por generación. Por esto se espera que pacientes no relacionados familiarmente porten mutaciones de origen independiente. Trabajos con HemB, enfermedad con las mismas características genéticas que la HemA, no sólo confirma la heterogeneidad muta-



**Fig. 3.**— Diagrama fuera de escala de una región normal del gen de FVIII en Xq28 y la inversión distal. Adaptación del publicado por Lakich et al en 1993<sup>28</sup>. La figura a) muestra el gen del FVIII con los exones 1-22 y 23-26 marcados. El área llena representa el intrón 22 que contiene al gen F8A (A) que transcribe en la dirección opuesta al gen del FVIII. 500 kb hacia el telómero del gen de FVIII se encuentran otras 2 copias del gen F8A. La figura b) muestra la inversión distal, donde el gen F8A del intrón 22 recombina con el F8A extragénico distal, separando los exones 1-22 de los 23-26 del gen del FVIII, provocando la incompleta transcripción de la secuencia del mRNA del FVIII. En la inversión proximal el gen F8A del intrón 22 recombina con el F8A extragénico más cercano.

cional esperada, sino que también muestra que el 97% de las mutaciones afectan o bien al promotor, a la secuencia codificante o a los sitios de splicing del gen de FIX (34 kb, 8 exones). En este contexto, es sorprendente que el 50% de los pacientes con HemA severa presente este tipo específico de inversión del intrón 22, reflejando quizás que el mecanismo molecular que le da origen, estaría favorecido por la maquinaria normal de crossing over en la meiosis masculina.

Actualmente el análisis de la inversión se considera de primera línea en el screening de pacientes con HemA severa pues permite caracterizar al 50% de las familias sin los posibles errores ya referidos que acarrea el análisis por Gene Tracking.

### Perspectivas

El tratamiento de la HemA o B severa consiste en la administración de concentrados del factor de coagulación, ya sea derivados del plasma o de origen recombinante (producidos *in vitro* por métodos de ingeniería genética). Los concentrados plasmáticos han salvado muchas vidas y evitado discapacidades, sin embargo, su utilización se ha complicado por la posibilidad de infección con patógenos de origen viral, particularmente el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) y los virus causantes de la hepatitis A, B y C (HAV, HBV y HCV). Hoy pueden obtenerse concentrados seguros por técnicas de purificación con anticuerpos monoclonales (MoAb), inactivación por calentamiento o tratamiento con detergentes viricidas. La tecnología del DNA recombinante (r) ha desarrollado una serie de «productos sintéticos»: rFVIII para el tratamiento de la HemA, rFVIIa para el tratamiento de la inhibición por anticuerpos en ambas hemofilias y rFIX para la HemB. Por ahora el uso de estos productos recombinantes se ha mostrado confiable y eficiente pero lamentablemente caro. Está clínicamente probado que para prevenir o controlar los episodios de sangrado de los pacientes con hemofilia, es preferible la liberación continua de los factores de coagulación que su administración intermitente. Al menos desde un primer acercamiento teórico, la terapia génica (GT) propone un medio seguro de liberación continua del rFVIII o rFIX en magnitud suficiente para aliviar o curar la enfermedad.

### Hacia la terapia génica

Este nuevo aporte de la ingeniería genética ofrecería una posibilidad de tratamiento para la hemofilia que, potencialmente, podría liberar a los pacientes de los actuales regímenes de inyección intravenosa regular de proteínas y del riesgo de infección por virus. Sin embargo, a pesar de que la terapia génica resulta muy atractiva para médicos y pacientes, en la práctica los experimentos de nivel pre-clínico en modelos animales sugieren que es difícil obtener niveles terapéuticos adecuados del FVIII o FIX por largos períodos de tiempo. Los progresos que se han hecho en estos estudios pre-clínicos resultan más alentadores para HemB que para HemA, quizás reflejando el mayor tamaño y complejidad funcional y estructural del FVIII sobre el FIX.

Los primeros ensayos pre-clínicos utilizando terapia génica en hemofilia comenzaron en China, para HemB. La factibilidad inicial de este método fue analizada inicialmente en conejos antes de ser aplicada a dos hermanos afectados por HemB. Se utilizó la estrategia *ex vivo*: ésta consiste en la modificación genética *in vitro* de células cultivadas (fibroblastos explantados) para la producción de la proteína deseada (transducción del gen del FIX humano por medio de un vector retroviral que permite su integración al genoma del hospedador) y finalmente a la restitución de estas células funcionales al paciente<sup>30, 31</sup>. La reimplantación de los fibroblastos transgénicos no mostró complicaciones secundarias tales como tumorigenicidad, reacción alérgica ni presencia de endotoxinas o de retrovirus salvaje. La concentración sérica de FIX en los pacientes aumentó al doble y las tendencias hemorrágicas se corrigieron parcialmente. Lo que se logró es expresión transiente del FIX, por lo cual debieron ensayarse repetidos reimplantes de los fibroblastos transgénicos autólogos, alcanzando cada uno, 2 años de resultados satisfactorios.

En HemA, la reciente experiencia de un grupo americano nos muestra que logró la expresión en ratones del rFVIII humano, también por medio de la estrategia *ex vivo* (en fibroblastos y con un vector retroviral) y por medio del reimplante, niveles plasmáticos terapéuticos del FVIII:C por más de 1 semana. Se observó además que la capacidad de estas células primarias de liberar al rFVIII a la circulación,

dependía significativamente del sitio de implante<sup>32</sup>.

El cauto optimismo con el que esperamos que aparezcan en los próximos años los ajustes finales de estas estrategias terapéuticas se basan en dos observaciones: primero, el avance acelerado que está produciéndose en disciplinas básicas relacionadas a los problemas planteados (como la inmunología y la genética molecular) y segundo, el grado de desarrollo actual de los resultados alcanzados hasta el presente.

## Summary

### *Molecular genetics of hemophilia A*

Hemophilia A (HemA), an X linked genetic disease, is the most common coagulation disorder with an incidence of about 1-2 in 10,000 males and is caused by mutations in the factor VIII (FVIII) coagulation gene. Firstly, some clinical aspects of the HemA are presented: the current methods to assess both the amount and activity of FVIII, the severity range observed and the presence of inhibitor antibodies against the therapeutic FVIII. Follows a discussion of the relationship of the structural domains of the FVIII protein (Figure 1), the aminoacidic sequence and their functions. An activation-inactivation model of the successive peptide bonds cleavages of the FVIII is also presented (Figure 2). After the cloning of the FVIII gene in 1984, almost all types of HemA causing mutations have been characterized. However, the size and complexity of this gene prevented a screening of the full range of mutations for an accurate molecular diagnosis. Moreover, most of the patients with moderate and mild disease have missense mutations whereas approximately half of severe patients have nonsense, frameshift, and some missense mutations. There are also less frequently mutations such as deletions and insertions leading to severe phenotype and mutations affecting mRNA splicing and duplications causing both severe and mild HemA. In order to give genetic counselling in HemA families, studies at the DNA level using intragenic and/or extragenic polymorphism analysis have been used. But this approach is not entirely satisfactory because it fails in several situations. Most of the causing mutations described above are private, and they have been found in only a few unrelated families. Recently, a common molecular inversion of the FVIII gene was identified in 50% of unrelated patients with severe HemA. The inversion is mediated by the presence of three

copies of a particular DNA sequence (termed F8A gene). One copy is located within intron 22 of the FVIII gene and the other two, 500 kb upstream. An homologous recombination mechanism was proposed for the inversion between an intragenic copy of the F8A gene and either the distal (80% of the inversion) or the proximal copy (20%). Both of these inversions lead to severe HemA because no intact FVIII is produced and can be easily diagnosed by Southern blot analysis. This inversion originates almost exclusively in male germ cells, because pairing Xq with its homologous in female meiosis would probably inhibit the proposed intrachromosome recombination. The molecular analysis of the inversion of intron 22 is now considered as the first line for families with severe HemA patients. In recent years the treatment of patients with hemophilia A and B has been intravenous injection of FVIII or FIX concentrates, respectively. This regimen of regular injection of plasmatic proteins bears a high risk of infection by contaminating viruses (HIV, HBV, etc). Future treatment for patients with hemophilia may include the use of either gene therapy or recombinant coagulation factors. Both strategies would completely avoid the infection risk offering a safe and effective treatment for the disease. Recombinant factors, obtained by genetic engineering methods, provide a renewable and unlimited source of FVIII or FIX. The clinical trials of recombinant factors have already started in mid-1995 giving positive results. On the other hand, gene therapy for hemophilia is now in the pre-clinical stage but offers the prospect of a cure for the disease, thus potentially freeing patients from regular injections of the lacking protein. However, experiments in animal models suggest that it may be difficult to obtain adequate therapeutic levels of factors for long periods of time. Recently, a retroviral-mediated gene delivery of human FVIII in mice has been reported using the *ex vivo* strategy of gene therapy. Therapeutic levels of FVIII in the circulation were obtained for > 1 week and it was also observed that the capacity of primary cells to deliver FVIII in blood was strongly dependent on the site of implantation. Although much work remains to be done, these positive results are encouraging for the future of gene therapy for this relatively common genetic disease.

## Bibliografía

1. Graham JB, Buckwalter JA, Harley LJ, Brinhou KM. Canine hemophilia: Observations of the course, the clotting anomaly and the effect of blood transfusions. *J Exp Med* 1949; 90: 97-100.

2. McKusick VA. The earliest record of hemophilia in America? *Blood* 1962; 19: 243-4.
3. McKusick VA. Mendelian Inheritance in Man. A catalog of human genes and genetics disorders. Eleventh edition. Baltimore: The John Hopkins University Press 1994; Vol II: 2384-93.
4. Vehar GA, Keyt B, Eaton D et al. Structure of human factor VIII. *Nature* 1984; 312: 337-42.
5. Tuddenham EGD, Cooper DN, Gitschier J et al. Haemophilia A: database of nucleotide substitutions, deletions, insertions and rearrangements of the factor VIII gene. *Nucleic Acids Res* 1991; 19: 4821-33.
6. Wood WI, Capon DJ, Simonsen CC et al. Expression of active human factor VIII from recombinant DNA clones. *Nature* 1984; 312: 330-6.
7. Stubbs JD, Lecutis C, Singer KL et al. cDNA cloning of a mouse mammary epithelial cell surface protein reveals the existence of epidermal grow factor-like domains linked to factor VIII-like sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 8417-21.
8. Pittman DD, Kaufman RJ. Proteolytic requirements for thrombin activation of anti-hemophilic factor (factor VIII). *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 2429-33.
9. Foster PA, Fulcher CA, Houghton RA, Zimmerman TS. Synthetic factor VIII peptides with amino acid sequences contained within the C2 domain of factor VIII inhibit factor VIII binding to phosphatidylserine. *Blood* 1990; 75: 1999-2004.
10. Gitschier J, Wood WI, Goralka TM et al. Characterization of the human factor VIII gene. *Nature* 1984; 312: 326-30.
11. Toole JJ, Knopf JL, Wozney JM et al. Molecular cloning of a cDNA encoding human antihemophilic factor. *Nature* 1984; 312: 342-7.
12. Gitschier J, Wood WI, Tuddenham EGD et al. Detection and sequence of mutations in the factor VIII gene of haemophiliacs. *Nature* 1985; 315: 427-30.
13. Gitschier J, Kogan S, Levinson B et al. Mutations of factor VIII cleavage sites in hemophilia A. *Blood* 1988; 72: 1022-8.
14. Kogan SC, Gitschier J. Mutations and a polymorphism in the factor VIII gene discovered by denaturing gradient gel electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 2092-6.
15. Higuchi M, Kazazzian HH, Kasch L et al. Molecular characterization of severe hemophilia A suggest that about the mutations are not within the coding regions and splice junctions of the factor VIII gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 7405-9.
16. Higuchi M, Antonarakis SE, Kasch L et al. Molecular characterization of mild-to-moderate hemophilia A: Detection of the mutation in 25 of 29 patients by denaturing gradient gel electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 8307-11.
17. Naylor J, Brinke A, Hassock S, Green PM, Giannelli F. Characteristic mRNA abnormality found in half the patients with severe haemophilia A is due to large inversions. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 1773-8.
18. Jenkins PV, Collins PW, Goldmar E et al. Analysis of intron 22 inversions of the factor VIII gene in severe hemophilia A: Implications for genetic counseling. *Blood* 1994; 84: 2197-201.
19. Windsor S, Taylor SAM, Lillicrap D. Direct detection of a common inversion mutation in the genetic diagnosis of severe hemophilia A. *Blood* 1994; 84: 2202-5.
20. Green PP, Mannucci PM, Briet E et al. Carrier detection in hemophilia A: A cooperative international study. II The efficacy of an universal discriminant. *Blood* 1986; 6: 1506-7.
21. Janco RL, Phillips III JA, Orlando PJ, Woodard MJ, Wion KL, Lawn RM. Detection of hemophilia A carriers using intragenic factor VIII:C DNA polymorphisms. *Blood* 1987; 69: 1539-41.
22. Kogan SC, Doherty M, Gitschier J. An improved method for prenatal diagnosis of genetic diseases by analysis of amplified DNA sequences. *N Engl J Med* 1987; 317: 985-90.
23. Moodie P, Liddell MB, Peake IR, Bloom AL. Carrier detection in 50 haemophilia A kindred by means of three intragenic and two extragenic restriction fragment length polymorphisms. *Br J Haematol* 1988; 70: 77-84.
24. Gitschier J, Levinson B, Lehesjoki AE, De La Chapelle A. Mosaicism and sporadic haemophilia: Implications for carrier determination. *Lancet* 1989; 4: 273-4.
25. Lillicrap DP, Taylor SAM, Shuringa PCR et al. Variation of the non-factor VIII sequences detected by a probe from intron 22 of the factor VIII gene. *Blood* 1990; 1: 139-43.
26. Lalloz MRA, McVey JH, Pattinson JK, Tuddenham EGD. Haemophilia A diagnosis by analysis of a hypervariable dinucleotide repeat within the factor VIII gene. *Lancet* 1991; 338: 207-11.
27. Kazazzian HH, Wong C, Youssoufian H, Scott AF, Phillips DG, Antonarakis SE. Haemophilia A resulting from de novo insertion of L1 sequences represents a novel mechanism for mutation in man. *Nature* 1988; 332: 164-6.
28. Lakich D, Kazazzian HH, Antonarakis SE, Gitschier J. Inversions disrupting the factor VIII gene are common cause of severe haemophilia A. *Nature Genet* 1993; 5: 236-41.
29. Rossiter JP, Young M, Kimberland ML et al. Factor VIII gene inversions causing severe hemophilia A originate almost exclusively in male germ cells. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 1035-9.
30. Lu DR, Zhou JM, Zheng B, Qiu XF, Hsueh JL. Stage I clinical trial of gene therapy for hemophilia B. *Sci China* 1993; 36: 1343-51.
31. Zhou JM, Qiu XF, Lu DR, Hsueh JL. Long term expression of human factor IX cDNA in rabbits. *Sci China* 1983; 36: 1333-41.
32. Dwarki VJ, Belloni P, Nijjar T et al. Gene therapy for hemophilia A: production of therapeutic levels of human factor VIII in vivo in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 1023-7.